

**IDENTIFIKASI GEN OVGP1 PADA OVIDUK  
KAMBING PE DENGAN KISTA OVARIUM  
MENGUNAKAN METODE POLYMERASE  
CHAIN REACTION (PCR)**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**FEBRY SYSDITYAWAN RAMADHAN  
145130101111053**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

# IDENTIFIKASI GEN OVGP1 PADA OVIDUK KAMBING PE DENGAN KISTA OVARIUM MENGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

## SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**FEBRY SYSDITYAWAN RAMADHAN**  
**145130101111053**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Identifikasi Gen OVGP1 Pada Oviduk Kambing PE  
Dengan Kista Ovarium Menggunakan Metode  
Polymerase Chain Reaction (PCR)**

**Oleh:  
FEBRY SYSDITYAWAN RAMADHAN  
145130101111053**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 20 Juli 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Dra. Herawati , MP**  
NIP. 19580127 198503 2 001

**drh.Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech**  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Febry Sysdityawan Ramadhan  
NIM : 145130101111053  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

### **Identifikasi Gen OVGP1 Pada Oviduk Kambing PE Dengan Kista Ovarium Menggunakan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Juli 2018  
Yang menyatakan,

**(Febry Sysdityawan Ramadhan)**  
**NIM. 145130101111053**

## IDENTIFIKASI GEN OVGP1 PADA OVIDUK KAMBING PE DENGAN KISTA OVARIUM MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

### ABSTRAK

Kista ovarium merupakan gangguan yang ditandai dengan adanya pertumbuhan sel-sel otot polos pada ovarium membentuk seperti balon yang berisi cairan. Oviductal Glycoprotein (OVGP1) disekresikan pada oviduk dan berperan dalam perkembangan embrio awal. Kejadian kista ovarium diduga dapat mempengaruhi tingkat ekspresi dari gen OVGP1. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi gen OVGP1 sebagai biomarker untuk deteksi kista ovarium pada kambing dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel yang digunakan yaitu DNA yang diisolasi dari oviduk kambing PE betina normal dan kambing dengan kista ovarium folikuler yang diperoleh dari RPH. Identifikasi gen OVGP1 dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer *forward* (OVN1\_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' dan primer *reverse* (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'. Sekuensing hasil PCR dilakukan dengan metode *Sanger*. Analisa sekuen gen menggunakan program *Bioedit* dan NCBI BLAST dengan membandingkan sekuen hasil PCR pada kista ovarium folikuler dan normal ovarium dengan gen OVGP1 dari gene bank (NM\_001285584.1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua sampel normal dan dua sampel kista folikuler memiliki kemiripan diatas 90% dengan gen OVGP1 dari genebank NM\_001285584.1. Sampel yang mengalami kista ovarium folikuler menunjukkan adanya perubahan susunan basa nukleotida berupa delesi, insersi, transisi dan transversi sehingga mempengaruhi susunan asam amino. Susunan asam amino pada sampel yang mengalami kista ovarium folikuler didapatkan adanya peningkatan jumlah proline (P), threonine (T) dan serine (S). Kesimpulannya terdapat perbedaan sekuen gen OVGP1 pada sampel kista ovarium folikuler dibandingkan dengan sampel ovarium normal. Sehingga gen OVGP1 bisa digunakan sebagai penanda kista ovarium folikuler.

Kata kunci : Kambing Peranakan Etawa, kista ovarium, OVGP1, PCR

## **IDENTIFICATION OF OVGP1 GEN IN OVIDUCT PE GOATS WITH OVARUM CYSTS USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD**

### **ABSTRACT**

Ovarian cysts are a disorder characterized by the growth of smooth muscle cells in the ovaries forming like fluid-filled balloons. Oviductal Glycoprotein (OVGP1) is secreted in the oviduct and plays a role in early embryonic development. The incidence of ovarian cysts is thought to affect the level of expression of the OVGP1 gene. The purpose of this study was to determine the potency of OVGP1 gene as biomarker for detection of ovarian cyst on goats by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The samples used were DNA isolated from normal female PE goat oviduct and goat with follicular ovarian cyst obtained from RPH. The OVGP1 gene identification was performed by PCR method using 5'-GACTGCAACCCACACAAGGA-3 forward primer (OVN1 \_F) and reverse primer (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3 '. The sequencing of PCR results is done by Sanger method. The gene sequence analysis used the Bioedit and NCBI BLAST programs by comparing the PCR sequence on the follicular ovarian cyst and the normal ovary with the OVGP1 gene of the gene bank NM\_001285584.1. The results showed that two normal samples and two samples of follicular cysts had similarities above 90% with OVGP1 genebank NM\_001285584.1. Samples with follicular ovarian cysts indicate a change in nucleotide base sequence due to deletions, insertions, transitions and transversions that affect the amino acid sequence. The arrangement of amino acids on samples with follicular ovarian cysts found an increase in the number of proline (P), threonine (T) and serine (S). In conclusion there is a difference in OVGP1 gene sequences in sample follicular ovarian cysts compared with sample normal ovaries . So the OVGP1 gene can be used as a marker of follicular ovarian cysts.

**Keywords:** PE Goats, ovarian cysts, OVGP1, PCR



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi yang berjudul **“IDENTIFIKASI GEN OVGP1 PADA OVIDUK KAMBING PE DENGAN KISTA OVARIUM MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal praktek kerja lapang yaitu:

1. Dr. Dra. Herawati , MP selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan
2. drh. Dyah Ayu Oktaviani AP, M.Biotech selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan
3. drh. Desi Wulansari, M.Vet selaku dosen penguji I atas masukan dan kritik sarannya.
4. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen penguji II atas masukan dan kritik sarannya.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DESselaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
6. Keluarga penulis, Ayah Budi Sutrisno dan Ibu Sri Sayekti yang selalu memberikan dukungan, memberikan kasih sayang, dorongan dan dukungan moril dan materil yang tak terhingga.
7. Atiqoh Rozana Amalia sebagai penyemangat dan motivasi diri.
8. Teman seperjuangan skripsi TIM OVGP1 yang selalu memberikan semangat, kegembiraan, saran kepada penulis.
9. Seluruh teman di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, terutama kelas 2014C yang telah berbagi waktu bersama selama 4 tahun masa studi pendidikan dokter hewan . Kontrakan Avengers yang selalu memberikan smangat dan menemani perjalanan penulis di FKH sampai sejauh ini.

10. Seluruh kolega di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan semangat, inspirasi dan mimpi-mimpi luar biasa.

Penulis menyadari bahwa proposal skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut. Penulis berharap proposal skripsi ini dapat diterima sehingga dapat memberikan pengalaman serta wawasan baru khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca.

Malang, 20 Juli 2018

Penulis





## DAFTAR ISI

### Halaman

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Kambing .....	5
2.1.1 Klasifikasi. ....	5
2.1.2 Kambing PE.....	6
2.2 Kista Ovarium .....	7
2.3 Gen OVGP1.....	10
2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	12
2.6 Sekuensing DNA .....	15
2.7 Polimorfisme Gen.....	17
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	19
3.3 Hipotesis Penelitian .....	21
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	22
4.2 Alat dan Bahan .....	22

4.3	Tahapan Penelitian .....	22
4.4	Rancangan Penelitian .....	23
4.5	Prosedur Kerja .....	23
4.5.1	Pemilihann dan pengambilan sampel organ reproduksi.....	23
4.5.2	Isolasi DNA.....	24
4.5.3	Uji Kuantitas dan Kualitas DNA.....	24
4.5.4	Desain Primer.....	26
4.5.5	Proses Polymerase Chain Reaction (PCR).....	26
4.5.6	Uji Kualitas Produk PCR .....	26
4.5.7	Purifikasi Produk PCR .....	27
4.5.8	Sekuensing DNA.....	27
4.5.9	Analisa Data.....	27
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>29</b>
5.1	Isolasi DNA dari Sampel Oviduk Kambing PE Betina.....	29
5.2	Amplifikasi Gen OVGP1 dengan Metode PCR.....	31
5.3	Hasil Analisa Sekuen Gen OVGP1.....	33
5.4	Hasil Analisa Asam Amino.....	35
<b>BAB 6 PENUTUP.....</b>		<b>39</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>40</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>44</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Kambing Peranakan Etawa .....	7
Gambar 2.2 Skema sekuensing DNA metode sanger .....	17
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual .....	19
Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%).....	30
Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%).....	32
Gambar 5.3 Hasil penyejajaran basa nukleotida menggunakan program Bioedit.....	34
Gambar 5.4 Hasil penyejajaran Asam amino menggunakan program Bioedit.....	35

# DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Kambing PE Betina .....	29
Tabel 5.2 Urutan nukleotida primer gen OVGP1 Kambing PE.....	31
Tabel 5.3 Program PCR untuk amplifikasi gen OVGP1 Kambing PE .....	31
Tabel 5.4 Hasil Penyejajaran dengan database NCBI.....	33
Tabel 5.5 Presentase asam amino dari tiap sampel dan gen OVGP1 .....	39



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Kerangka Konseptual .....	45
Lampiran 2. Protokol Isolasi DNA (Genomic DNA mini kit tissue).....	46
Lampiran 3. Desain Primer .....	47
Lampiran 4. Protokol Purifikasi Produk PCR.....	51
Lampiran 5. Hasil BLAST Gen OVGP1 Keempat Sampel.....	52



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Double distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
G	Gram
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
OVGP1	Oviductal Glycoprotein 1
PE	Peranakan Etawa

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kambing peranakan etawa merupakan ternak dwiguna, yang dipelihara untuk menghasilkan susu dan daging. Kambing peranakan etawa memiliki kemampuan menghasilkan susu yang lebih baik dibandingkan dengan kambing lokal lainnya, dengan produksi susu antara 1,0-1,5 ltr/hari. Kambing peranakan etawa di Indonesia memiliki keunggulan kompetitif dan relatif lebih mempunyai laju reproduksi yang baik (Aron, 2016).

Berdasarkan data Kementerian Pertanian RI (2017), Populasi kambing di Indonesia sebanyak 18.410.379 ekor dan domba 16.462.274 ekor atau total sekitar 34,8 juta ekor, populasi tersebut bila dibanding dengan penduduk Indonesia masih sangat kecil yaitu baru sekitar 13,60% dari jumlah penduduk. Salah satu permasalahan sektor peternakan kambing adalah gangguan pada alat reproduksi. Reproduksi sangat penting dalam bidang peternakan, ketika reproduksi terganggu akan mempengaruhi peranakannya. Salah satu penyakitnya adalah kista ovarium.

Oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) juga disebut oviductin adalah protein spesifik oviduk dan berperan dalam proses pembuahan. OVGP1 telah terbukti diekspresikan secara eksklusif oleh oviduk. Namun, baru-baru ini penelitian telah menunjukkan ekspresinya pada beberapa jenis kanker. Pengamatan ini berhipotesis bahwa mungkin OVGP1 memiliki ekspresi ekstra-oviductal. OVGP1 mRNA diekspresikan dalam testis, epididimis dan ovarium, tapi tidak di rahim, vagina, serviks, payudara, vesikula dan kelenjar prostat. Didalam ovarium, OVGP1 dan protein terdeteksi di permukaan epitel, sel granulosa dan korpus



luteum. Ekspresi OVGP1 ditemukan lebih tinggi pada tahap estrus daripada pada tahap diestrus pada ovarium dan oviduk (Saniya, 2017).

Kista ovarium merupakan perbesaran sederhana ovarium normal, folikel de graf atau korpus luteum atau kista ovarium dapat timbul akibat pertumbuhan dari epithelium ovarium (Smelzer *et al*, 2002). Pada kambing ada empat jenis kista yang sering terjadi yaitu, para-ovarian cyst, follicular cystic ovary, cystic corpus luteum, luteal cystic ovary (Karim, 2017). Pada penelitian ini kista ovarium yang digunakan yaitu follicular cystic ovary. Menurut Herry (2015), gejala klinis hewan yang menderita kista folikel adalah nimphomani (birahi terus-menerus) dalam satu siklus birahi tapi tidak terjadi ovulasi. Hal ini terjadi karena adanya kistanya terdiri dari banyak folikel sehingga terjadi akumulasi hormon estrogen dalam darah.

Selama ini pemeriksaan untuk mendeteksi adanya kista folikuler yaitu dengan menggunakan metode USG. Kista folikuler dalam gambaran USG bersifat unilocular, mempunyai dinding yang tipis dan gambaran isi anechoic karena berisi cairan. Dinding posterior tampak hyperechoic karena refleksi dari sinar USG (Khan dkk, 2015). Penyakit kista ovarium tidak bisa diduga karena tidak menunjukkan gejala klinis khusus seperti penyakit lainnya dan banyak sekali kasus penyakit kista baru terdeteksi saat penyakitnya sudah parah. Sehingga sangat penting untuk dilakukan deteksi secara dini. Salah satunya dengan menggunakan screening secara genetik. Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengurangi presentasi kambing terkena kista ovarium karena faktor genetik.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana profil sekuen gen OVGP1 pada kambing PE betina dengan kondisi kista ovarium folikuler dibandingkan dengan kambing PE normal dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) ?
2. Apakah gen OVGP1 dapat digunakan menjadi biomarker dalam kejadian kista ovarium folikuler pada kambing PE ?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah jaringan oviduk kambing PE betina yang berasal dari Rumah Potong Hewan dengan kondisi normal ovarium dan kista ovarium folikuler
2. Gen OVGP1 diisolasi dari jaringan oviduk kambing menggunakan produk dari Geneaid yaitu Genomic DNA mini kit tissue
3. Primer gen OVGP1 didesain menggunakan gen OVGP1 dari gene bank (*capra hircus*) NM\_001285584.1 menggunakan program Primer 3plus.
4. Amplifikasi DNA gen OVGP1 kambing dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (OVN1\_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' dan primer *reverse* (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'
5. Metode PCR dilakukan dengan mesin SensoQuest Thermocycler dengan program: predenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 55,8°C selama 30 detik, extension 72°C selama 30 detik, dan post extension 72°C selama tujuh menit dengan 35 kali pengulangan menggunakan kit dari Bio-Rad®.

6. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode *dye terminator labelling* dengan menggunakan sepasang primer *forward* (OVN1\_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' dan primer *reverse* (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'

7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen gen OVGP1 dan asam amino yang terbentuk dari ovarium normal dan kista ovarium folikuler dibandingkan dengan gen OVGP1 dari *Genebank* : NM\_001285584.1 dengan program Bioedit, MEGA dan NCBI BLAST.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui profil sekuen gen OVGP1 kambing PE betina dengan kondisi kista ovarium folikuler dibandingkan dengan kambing PE normal dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR)
2. Untuk mengetahui apakah gen OVGP1 dapat digunakan menjadi biomarker dalam kejadian kista ovarium folikuler pada kambing PE

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam informasi genetik berupa sekuen gen dan untuk biomarker kista ovarium folikuler sejak dini sehingga dapat menghindari penyakit kista ovarium.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kambing

#### 2.1.1 Klasifikasi

Menurut Mileski and Myers (2004), ternak kambing memiliki klasifikasi ilmiah antara lain adalah :

Kerajaan : *Animalia*  
Filum : *Chordata*  
Kelas : *Mammalia*  
Ordo : *Artiodactyla*  
Famili : *Bovidae*  
Sub family : *Caprinae*  
Genus : *Capra*  
Spesies : *C. Aegagrus*

Kambing merupakan ternak jenis ruminansia kecil. Kambing merupakan jenis ternak yang sudah lama dibudayakan. Memelihara kambing tidaklah sulit karena pakannya beragam. Banyak hijauan yang dapat dijadikan makannya. Jenis daun-daunan cukup digemari oleh kambing antara lain daun turi, lamtoro dan angka. Beberapa jenis kambing asli indonesia yang paling digemari dimasyarakat yaitu kambing peranakan etawa dan kambing kacang. Kedua jenis kambing ini sangat baik dengan kondisi di indonesia karena mampu beradaptasi dengan baik serta kemampuan yang lebih efisien dalam mengubah pakan menjadi produk ternak berupa susu dan daging. Kambing memiliki ekor yang lebih pendek

daripada domba. Pada kambing jantan dewasa memiliki janggut yang mengeluarkan bau khas (Pamungkas dkk, 2009).

### 2.1.2 Kambing PE

Kambing Peranakan Etawa (PE) merupakan kambing hasil persilangan antara kambing Etawah dengan kambing Kacang. Kambing ini tersebar hampir di seluruh Indonesia. Penampilannya mirip kambing Etawah, tetapi lebih kecil. Kambing PE merupakan kambing tipe dwiguna, yaitu sebagai penghasil daging dan susu. Kambing PE memiliki telinga panjang dan terkulai, panjang telinga 18–30 cm, warna bulu bervariasi dari coklat muda sampai hitam. Bulu kambing PE jantan bagian atas leher dan pundak lebih tebal dan agak panjang. Bulu kambing PE betina pada bagian paha panjang. Berat badan kambing PE jantan dewasa 40 kg dan betina 35 kg, tinggi pundak 76-100 cm (Prabowo, 2010).

Menurut Mulyono dkk (2008), ciri khas kambing PE antara lain bentuk muka cembung dan dagu berjanggut, di bawah leher terdapat gelambir yang tumbuh berawal dari sudut janggut, telinga panjang, lembek, menggantung dan ujungnya agak berlipat, tanduk berdiri tegak mengarah ke belakang, panjang 6,5-24,5 cm, tinggi tubuh 70-90 cm, tubuh besar, pipih, bentuk garis punggung seolaholah mengombak ke belakang, bulu tubuh tampak panjang dibagian leher, 10 pundak, punggung dan paha, dengan pengelolaan budi daya secara intensif dapat diusahakan beranak tiga kali setiap dua tahun dengan jumlah anak setiap kelahiran 2-3 ekor, kambing PE lebih cocok di dataran sedang (500-700 mdpl) sampai dataran rendah yang panas.

Kambing PE dapat beranak tiga kali dalam dua tahun dengan rata-rata jumlah sekelahiran 1-3 ekor. Masa laktasi kambing perah sekitar 6-7 bulan. Meskipun hasil susu kambing sering direkomendasikan bisa mencapai 2-2,5 liter per ekor per hari, namun dalam praktiknya, para peternak kambing hanya mampu menghasilkan susu kambing sebanyak 1,2 liter per ekor per hari (Balai Penelitian Ternak, 2001). Kambing PE di Indonesia mampu menghasilkan susu 2-3 liter per ekor per hari dengan masa laktasi lebih dari 150 hari (Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan, 2003).



**Gambar 2.1** Kambing Peranakan etawa (Kusuma dkk, 2009).

## 2.2 Kista Ovarium

Kista merupakan bentuk gangguan yang bisa dikatakan adanya pertumbuhan sel-sel otot polos pada ovarium yang jinak. Walaupun demikian tidak menutup kemungkinan untuk menjadi tumor ganas atau kanker. Perjalanan penyakit ini sering disebut *silent killer* atau secara diam-diam menyebabkan banyak wanita yang tidak menyadari bahwa dirinya sudah terserang kista ovarium dan hanya mengetahui pada saat kista sudah dapat teraba dari luar atau membesar. Kista ovarium adalah benjolan yang membesar, seperti balon yang berisi cairan yang



tumbuh di indung telur. Kista tersebut disebut juga kista fungsional karena terbentuk selama siklus menstruasi normal atau setelah telur dilepaskan sewaktu ovulasi. Kista ovarium yang bersifat ganas disebut juga kanker ovarium. Kanker ovarium merupakan pembunuh yang diam-diam, karena memang seringkali pasien tidak merasakan apa-apa, sekalipun terjadi keluhan biasanya sudah lanjut (Benson, 2008).

Kista ovarium diklasifikasikan sebagai kista ovarium fungsional dan neoplasma ovarium kistik. Kista ovarium fungsional yang paling umum adalah kista folikel dan kista korpus luteum. Kista folikel terjadi ketika folikel ovarium gagal untuk ovulasi dan terus berkembang. Kista Corpus luteum dapat berkembang ketika korpus luteum gagal untuk regresi normal setelah ovulasi. Kista yang terjadi akibat dari proses fisiologis normal, maka disebut sebagai kista fungsional. Ovarium kistik neoplasma yang berasal dari pertumbuhan neoplastik. Dikategorikan menjadi tiga jenis berdasarkan pada sel yaitu permukaan tumor sel epitel, tumor germ cell dan stroma tumors. Tumor sel epitel merupakan neoplasma ovarium yang paling umum, namun yang paling umum neoplasma ovarium tunggal jinak adalah teratoma kistik jinak (juga dikenal sebagai kista dermoid) yang merupakan germ cell tumor (Cheryl, 2010).

Kista folikuler adalah folikel anovulatorik yang menetap pada ovarium selama 10 hari atau lebih, mempunyai diameter 1 – 1,5 cm. Kista folikel ini terjadi karena kurangnya hormon LH tetapi hormon FSH mempunyai kadar yang cukup dalam darah sehingga mendorong terbentuknya folikel folikel muda yang tidak pernah mengalami ovulasi sehingga disebut folikel anovulatorik. Kista folikel



mempunyai dinding yang tipis sehingga mudah pecah bila ditekan secara explorasi rektal. Sesudah pecah kista akan hilang dan ditandai dengan adanya legokan pada permukaan ovarium. Gejala klinis hewan yang menderita kista folikel adalah nymphomani (birahi terus-menerus) dalam satu siklus birahi tapi tidak terjadi ovulasi. Hal ini terjadi karena kistanya terdiri dari banyak folikel sehingga terjadi akumulasi dari hormon estrogen dalam darah (Herry, 2015).

Luteinizing Hormon (LH) dan Folikel Stimulating Hormon (FSH) yang dihasilkan kompleks hipotalamus-hipofisis berfungsi untuk meluruhnya korpus luteum ketika ovum tidak dibuahi. Pematangan folikel dominan yang tidak sesuai akan berakibat menginduksi kista. Selain itu akibat perkembangan folikel imatur tersebut akan memicu dihasilkannya estradiol yang merupakan pemicu kista ovarium. Perubahan ekspresi reseptor LH juga bisa menyebabkan anovulasi folikel. Keseimbangan hormon LH dan FSH yang tepat, akan membuat fase ovulasi dan pre-ovulasi folikel. Reseptor FSH dan LH di sel granulosa pada kondisi kista akan menurun jika dibandingkan dengan folikel normal. Disfungsi tingkat folikel dapat mengganggu kompleks hipotalamus-hipofisis akan mengubah ekspresi reseptor LH yang menginduksi anovulasi folikel (Susianti, 2017).

Riwayat keturunan merupakan faktor penting dalam memasukkan apakah seseorang wanita memiliki risiko terkena kista ovarium. Risiko wanita terkena kista ovarium adalah sebesar 1,6%. Apabila wanita tersebut memiliki keturunan yang mengindap kista, risikonya akan meningkat menjadi 4% sampai 5%. Dalam tubuh terdapat gen-gen yang berpotensi memicu kanker yaitu protoonkogen.

Karena faktor pemicu seperti pola hidup yang kurang sehat, protoonkogen bisa berubah menjadi onkogen yaitu gen yang dapat memicu timbulnya sel kanker (Rasjidi, 2009).

Di dalam sel terdapat banyak gen yang mempunyai fungsi khusus. Gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel diperkirakan ada banyak gen, yang merupakan golongan protoonkogen dan supressor gen atau anti onkogen yang kerjanya berlawanan. Protoonkogen mengkode pembentukan protein untuk merangsang pertumbuhan sedang antionkogen mengkode protein untuk menghambat pertumbuhan. Protoonkogen yang telah mengalami perubahan sehingga dapat menimbulkan kanker disebut onkogen. Kerusakan itu dapat terjadi pada saat fertilisasi, tetapi umumnya setelah embriogenesis, setelah sel itu mengadakan diferensiasi atau setelah dewasa (Sukardja, 2000).

### 2.3 Gen OVGP 1

Oviduk memiliki peran penting pada sistem reproduksi mamalia, yaitu menyediakan lingkungan yang optimal untuk maturasi oosit, kapasitas spermatozoa, fertilisasi, dan transportasi gamet dan embrio. OVGP terlokalisasi di zona pelusida, ruang perivitelin dan membran plasma oosit yang diperoleh dari oviduk secara *in vivo* dan embrio. Hal ini memungkinkan pentingnya peran OVGP dalam fertilisasi dan perkembangan embrio dini (Pratiwi dkk, 2017).

Sejak penemuan pertama pada tikus diketahui OVGP1 telah banyak ditandai dalam jumlah besar spesies hewan. Sebagian besar studi *in vitro* melibatkan keterlibatan OVGP1 dalam pembuahan dan awal perkembangan embrio (Buhi, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa OVGP1 memiliki kontribusi penting dalam

proses fertilisasi serta perkembangan embrio. Peranan oviductin pada saluran reproduksi kambing betina diharapkan dapat membantu meningkatkan *fertilization rate*.

Menurut Saniya (2017), OVGP1 adalah protein spesifik yang berada di oviduk. Teknik Northern blotting yang menggunakan tikus sebagai hewan coba, diketahui OVGP1 secara eksklusif terdeteksi di RNA dari oviduk tapi tidak ke jaringan lain seperti rahim, ovarium, limpa dan otak. Sejak penemuan ini, sejumlah penelitian, menggunakan alat seperti RT-PCR dan imunolokalisasi, pada manusia, tikus dan spesies lainnya telah menunjukkan ekspresi OVGP1 di oviduk. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa pada kejadian kanker ovarium, OVGP1 mRNA akan terdeteksi (Woo dkk, 2004).

Ekspresi protein OVGP1 diuji dengan imunohistokimia di jaringan yang mengekspresikan OVGP1. Didalam ovarium, protein OVGP1 dilokalisasi di sel-sel epitel permukaan. Pada folikel yang tumbuh, protein terdeteksi pada sel granulosa dan korpus luteum. Ekspresi tidak terdeteksi di sel teka dan sebagian besar stroma ovarium. Dalam beberapa kasus pewarnaan lemah OVGP1 terdeteksi pada oosit (Saniya, 2017).

Kenaikan ekspresi dan sekresi OVGP selama perkembangan folikel akhir sampai awal perkembangan embrio tahap *cleavage* mengimplikasikan adanya interaksi dengan gamet dan embrio. Pada beberapa spesies, OVGP terlokalisasi di zona pelusida, rongga perivitelin dan vitelin atau blastomer membran pada oviduk, oosit dan embrio. Pada beberapa spesies percobaan, ekspresi OVGP mRNA dan protein tergantung pada tahap siklus estrus, siklus menstruasi atau

awal kebuntingan dan dihubungkan dengan sirkulasi konsentrasi estrogen. (Buhi, 2002).

Penelitian terbaru menunjukkan peningkatan ekspresi OVGP1 pada kanker endometrium dan ovarium, menunjukkan bahwa OVGP1 memiliki beberapa ekspresi dan fungsi ovidukal ekstra (Woo dkk, 2004). OVGP1 mRNA dan protein terdeteksi di oviduk. Menariknya, juga terdeteksi mRNA OVGP1 di RNA yang diekstraksi dari ovarium (Sarah, 2009). Diduga pada kejadian kista ovarium juga menunjukkan peningkatan ekspresi OVGP1 dan beberapa ekspresi lainnya.

Ekspresi OVGP1 pada oviduk diketahui diekspresikan secara hormonal. Telah dilaporkan di hampir semua spesies yang mengekspresikan OVGP1 diinduksi oleh estrogen (Buhi, 2002). Tidak mengherankan, ekspresi OVGP1 lebih tinggi pada folikel folikel atau fase estrus yang ditandai oleh dominasi estrogen. Baik di ovarium ataupun oviduk, ekspresi dari OVGP1 lebih tinggi pada fase estrus dibandingkan dengan fase diestrus perbedaan regional dalam distribusi OVGP1 telah dilaporkan di hamster emas, domba, sapi dan anjing (Saint-Dizier dkk., 2014).

#### **2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

PCR atau *Polymerase Chain Reaction* adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*annealing primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang

primer (extension primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Secara umum keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier (Darmo, 2001).

Reaksi polimerase berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Metode ini dikembangkan pertama kali oleh Kary B. Mulis pada tahun 1985. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitas molekul mRNA (Elliwati, 2015).

Menurut Elliwati (2015), proses PCR terdiri dari tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA templat, penempelan (annealing) primer, dan polimerisasi (extension) rantai DNA. Denaturasi merupakan proses pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal DNA yang menjadi cetakan (templat) sebagai tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase, dengan pemanasan singkat pada suhu 90-95°C selama beberapa menit. Penjelasan ringkas tentang setiap siklus reaksi PCR adalah sebagai berikut:

#### 1). Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan

putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu  $90^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$ .

## 2).Penempelan Primer

Pada tahap penempelan primer (annealing), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu  $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya misalnya pada  $72^{\circ}\text{C}$ .

## 3). Reaksi Polimerisasi (Extension)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$ . Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3''nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polymerase. Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan di amplifikasi secara eksponensial (disebut ampikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah copy yang dapat dirumuskan dengan  $(2n)x$ . Dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA. Seandainya ada 1 copy DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial. PCR dengan menggunakan enzim Taq DNA polymerase pada



akhir dari setiap siklus akan menyebabkan penambahan satu nukleotida A pada ujung 3' dari potongan DNA yang dihasilkan. Sehingga nantinya produk PCR ini dapat di kloning dengan menggunakan vektor yang ditambahkan nukleotida T pada ujung-ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut thermocycler (Elliwati, 2015).

Selain ketiga proses tersebut, secara umum PCR didahului dan diakhiri oleh tahapan berikut:

a). Pradenaturasi

Dilakukan selama 1-9 menit di awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA Polymerase (jenis hot-start alias baru aktif kalau dipanaskan terlebih dahulu).

b). Final Elongasi

Biasanya dilakukan pada suhu optimum enzim (70-72°C) selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR terakhir (Elliwati, 2015).

## 2.6 Sekuensing DNA

Metode yang pertama kali dikembangkan oleh Frederick Sanger pada tahun 1975, yaitu dengan melakukan reaksi cycle sequencing pada empat tabung terpisah yang masing-masing berisi semua pereaksi yang dibutuhkan. Khusus untuk ddNTP, yang ditambahkan hanya 1 jenis untuk setiap tabung. Setiap tabung diberi tanda, A jika yang ditambahkan adalah ddATP, G jika ddGTP, C jika ddCTP dan T jika ddTTP (Campbell *et al*, 2002).

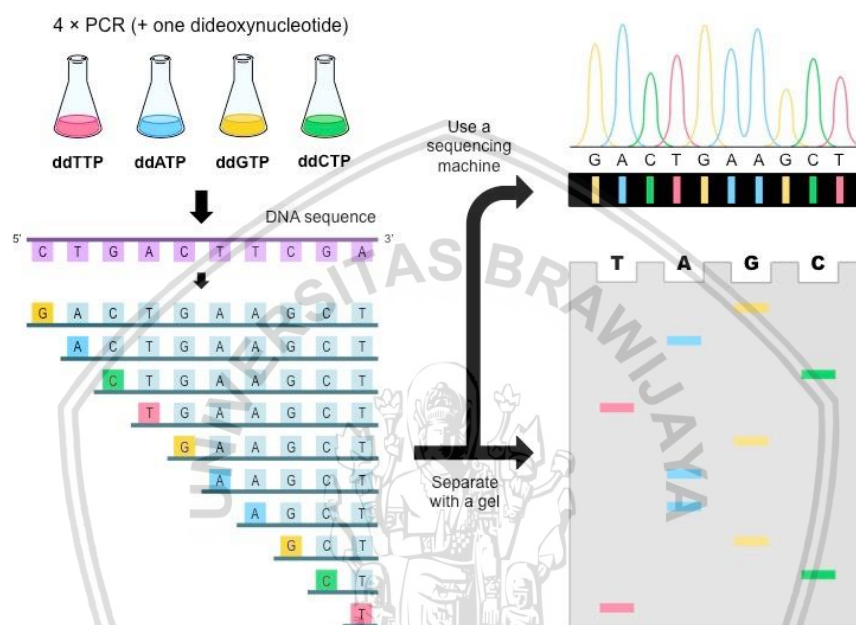


Proses sekuensing diawali oleh proses *cycle sequencing*. *Cycle sequencing* adalah proses amplifikasi dengan metode PCR untuk mendapatkan DNA untai tunggal yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk proses sekuensing (Sambrook *et al*, 2001). Setelah reaksi cycle sequencing selesai, keempat hasil reaksi tersebut dirunning pada gel electrophoresis sehingga fragmen-fragmen yang dihasilkan dapat terpisah. Urutan basa DNA dapat ditentukan dengan mengurutkan fragmen yang muncul dimulai dari yang paling bawah (paling pendek). Fragmen DNA dapat divisualisasi karena primer yang digunakan dilabel dengan radioaktif atau fluorescent. Pada teknik lain, bukan primer yang dilabel melainkan dNTP (Yuwono, 2005).

Skema pada **Gambar 2.2** menunjukkan tahapan sekuensing DNA dengan menggunakan metode Sanger. Empat campuran PCR disiapkan yang masing-masing campurannya mengandung stok basa nukleotida normal dan salah satu dideoksinukleotida (ddA, ddT, ddC atau ddG). Proses PCR akan menghasilkan lebih dari 1 juta molekul DNA, setiap campuran PCR harus menghasilkan semua fragmen terminasi untuk masing-masing basa dideoksinukleotida. Ketika fragmen dipisahkan menggunakan gel elektroforesis, sekuen basa nukleotida dapat ditentukan dengan mengurutkan fragmen menurut panjang sekuennya. Jika primer berlabel fluorescence dicampurkan dalam campuran PCR, maka deteksi fragmen dapat dilakukan secara otomatis menggunakan mesin sekuensing (Bioninja, 2017).

Hasil sekuensing urutan DNA atau protein dapat dilanjutkan secara online dan sederhana dengan BLAST. *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

adalah sebuah algoritma untuk membandingkan informasi urutan biologis primer, seperti nukleotida urutan DNA materi genetik yang sudah ada dalam *Batabase*. Ketika melakukan BLAST NCBI hasilnya diberikan dalam format grafis, tabel dan data skor (Fatchiyah, 2015).



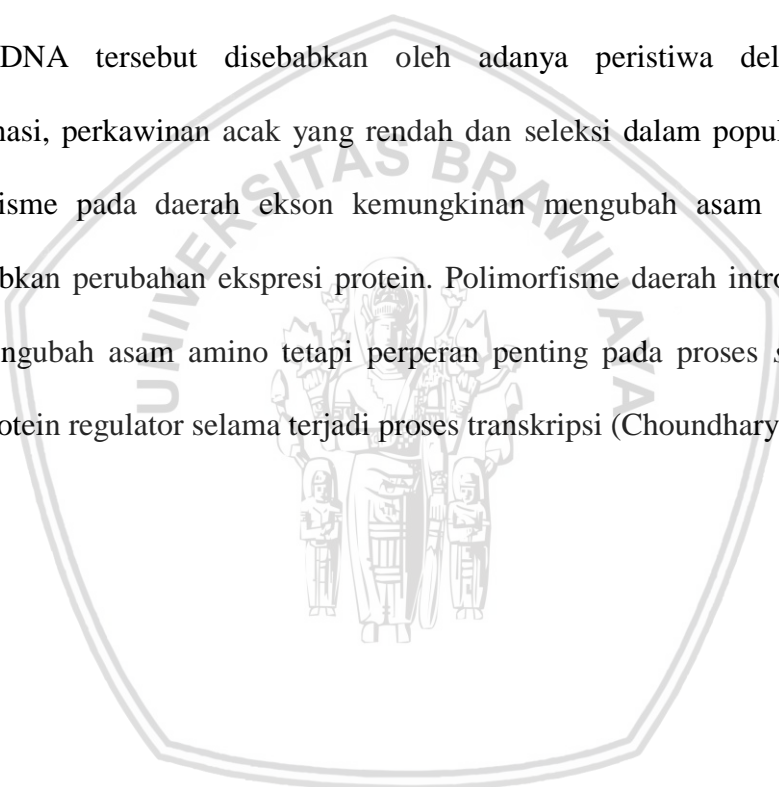
**Gambar 2.2** Skema sekuensing DNA metode Sanger (Bioninja, 2017)

## 2.7 Polimorfisme Gen

Polimorfisme merupakan varian dalam sekuens DNA yang dapat menyebabkan perubahan fungsi protein dalam tubuh, tetapi karena tubuh kita sangat kompleks sehingga terbentuk mekanisme kompensasi luar biasa untuk menormalkan fungsi tubuh, oleh karenanya orang yang mempunyai polimorfisme ini tetap dapat mewariskan gen nya ke keturunannya sehingga frekuensinya didalam populasi adalah lebih dari 1%. Polimorfisme digunakan dalam identifikasi dan predisposisi penyakit melalui mapping meiotik. Kegunaan SNP (single nucleotida polymorphism) dalam teknologi antara lain dapat digunakan

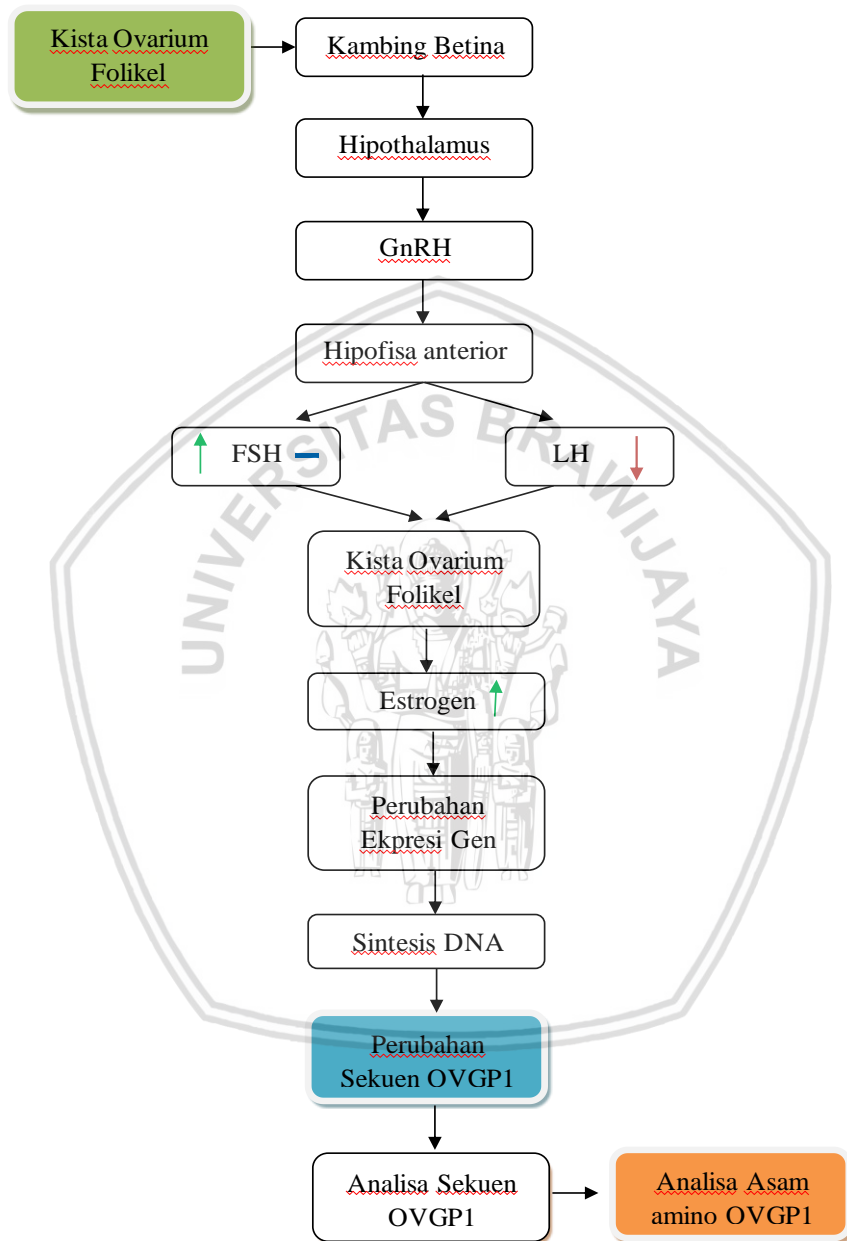
untuk menemukan dan memetakan gen, tes kandidat polimorfism berbasis hubungan, diagnostik dan profil resiko, prediksi respon terhadap rangsangan lingkungan, xenobiotik dan diet; pengujian homogenitas dan desain studi epidemiologi serta fisiologis genom (Schork *dkk.*, 2000).

Terjadinya polimorfisme pada suatu gen, menandakan adanya perbedaan sekuen DNA pada hewan dengan spesies yang berbeda maupun sama. Perbedaan sekuen DNA tersebut disebabkan oleh adanya peristiwa delesi, insersi, rekombinasi, perkawinan acak yang rendah dan seleksi dalam populasi tersebut. Polimorfisme pada daerah ekson kemungkinan mengubah asam amino yang menyebabkan perubahan ekspresi protein. Polimorfisme daerah intron meskipun tidak mengubah asam amino tetapi berperan penting pada proses *splicing* atau ikatan protein regulator selama terjadi proses transkripsi (Choundhary *dkk.* 2005).



## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1** Bagan Kerangka Konseptual

- : Variabel Kendali
- : Variabel Bebas
- : Variabel Bergantung

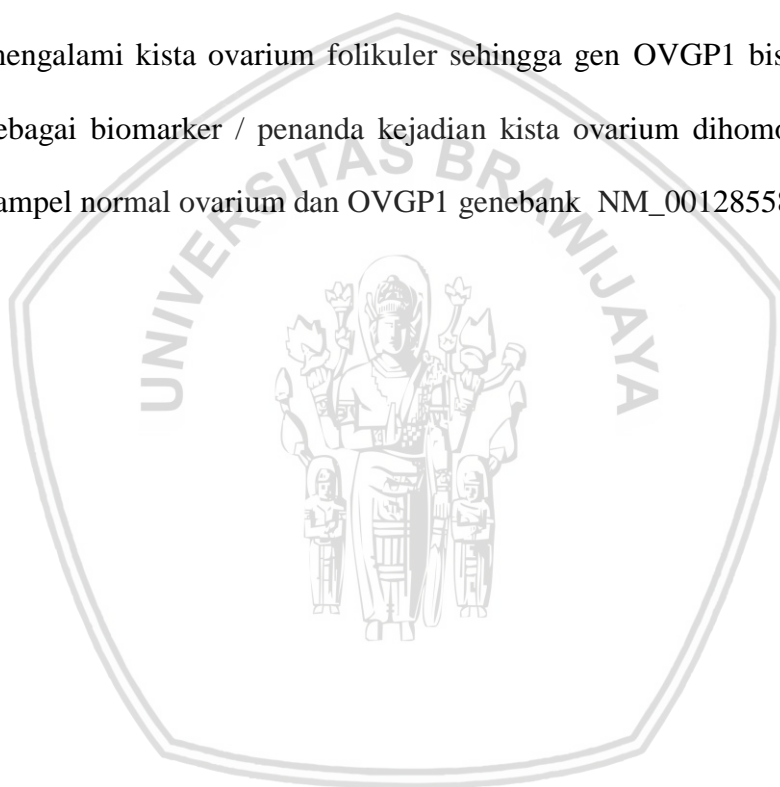
Kejadian penyakit kista ovarium folikuler pada kambing betina dapat diketahui melalui dengan melihat ekspresi gen OVGP1 dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel organ oviduk dapat digunakan untuk melihat sekuen gen OVGP1. Didalam oviduk, ekspresi OVGP1 diketahui diatur secara hormonal. Pada kejadian kista ovarium folikuler diawali dengan hipotalamus akan mekspresikan GnRH hingga dibawa ke hipofisa anterior. Hipofisa anterior akan melepaskan dua hormon gonadotropin yaitu FSH dan LH. Hormon FSH berfungsi merangsang pertumbuhan dan pematangan folikel, sedangkan fungsi LH untuk merangsang sel granulosa dan sel theca pada folikel yang matang untuk mensintesis estrogen, sehingga menyebabkan ovulasi. Tetapi pada kejadian kista ovarium folikuler terjadi akibat kurangnya hormon LH tetapi hormon FSH mempunyai kadar yang cukup dalam darah atau bisa juga tinggi sehingga mendorong pembentukan folikel-folikel muda yang tidak pernah mengalami ovulasi atau disebut juga folikel anovulasi. Karena banyaknya folikel yang terbentuk sehingga terjadi akumulasi dari hormon estrogen dalam darah. Hormon estrogen termasuk dalam hormon steroid yang memiliki target receptor di sitoplasma dan inti (kromatin), dalam kasus kista folikel jumlah estrogen yang tinggi akan mempengaruhi OVGP1. Karena aktifitas OVGP1 merupakan estrogen dependent. Maka ketika terjadi perubahan sekuensing OVGP1 dapat digunakan sebagai indikator awal terjadinya kista folikel. Ketika terjadi perubahan susunan sekuensing DNA maka kode sintesis protein akan berubah, tentu akan berkorelasi dengan perubahan sintesis OVGP1 pada saluran reproduksi. Menurut Fatchiyah (2015) , hasil sekuen urutan DNA atau protein dilanjutkan dengan aplikasi *Basic*

*Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui urutan biologi primer, seperti nukleotida urutan DNA materi genetik yang sudah ada dalam database.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Ada perbedaan sekuen Gen OVGP1 pada kambing PE betina yang mengalami kista ovarium folikuler sehingga gen OVGP1 bisa digunakan sebagai biomarker / penanda kejadian kista ovarium dihomologi dengan sampel normal ovarium dan OVGP1 genebank NM\_001285584.1



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September-Oktober 2017. Pengambilan sampel organ oviduk kambing betina dilakukan di RPH. Selanjutnya penelitian dilaksanakan di ADD Lab Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang

### 4.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *glove*, masker, *ice box*, kertas label, *microsentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, mesin vortex, sentrifugator, inkubator, *freezer*, timbangan analitik digital, *thermocycler*, mesin *sequencing*, komputer, *Bio Step UV-Transilluminator Scanner*, Mupid-Exu *Electrophoresis*, Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer, kamera dan *tissue*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian sampel organ oviduk kambing betina, Genomic DNA mini kit tissue, ddH<sub>2</sub>O, primer *forward* (OVN1\_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' dan primer *reverse* (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3', PCR *mix*, DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, TBE, agarosa 1% dan 2%, *loading dye*, alkohol 70%, aluminium foil, *Gel red* dan natrium asetat 3M.

### 4.1 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Pengambilan sampel berupa Oviduk
2. Isolasi DNA



3. Uji kualitas dan kuantitas DNA total
4. Desain primer
5. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
6. Uji kualitas produk PCR
7. Purifikasi produk PCR
8. Sekuensing DNA produk PCR
9. Analisa data

#### **4.4. Rancangan Penelitian**

Sebanyak 4 sampel organ oviduk kambing PE betina sebanyak 30 mg tiap hewan. Kemudian dilakukan isolasi DNA melalui sampel tersebut dengan menggunakan *Genomic DNA mini kit tissue*. Hasil isolasi DNA kemudian diukur konsentrasinya dengan menggunakan agarose 1%. Setelah itu, sampel DNA akan diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer yaitu primer *forward* (OVN1\_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' dan primer *reverse* (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3' selanjutnya hasil amplifikasi dilakukan uji dengan agarose 2%, kemudian disekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan program *BioEdit*, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.0 serta dianalisa secara deskriptif.

#### **4.5. Prosedur Kerja**

##### **4.5.1 Pemilihan Sampel Oviduk Kambing**

Sampel yang diambil yaitu berupa sampel oviduk kambing betina dilakukan di RPH. Sampel oviduk di ambil dari lokasi menggunakan ice box kemudian dilakukan pemisahan di laboratorium. Sampel berjumlah 4 yaitu 2 yang

mengalami kista ovarium folikuler dan 2 normal. Kualifikasi kista ovarium folikuler pada bagian permukaan adanya bentukan seperti balon yang berisi cairan dan mempunyai diameter 1-1,5 cm. Pada sampel normal tampak adanya folikel folikel pada bagian permukaan dan masih sesuai dengan ukuran normalnya.

#### 4.5.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel oviduk kambing betina menggunakan kit isolasi dari Geneaid yaitu *Genomic DNA mini kit tissue*. Mengikuti protokol untuk isolasi DNA. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Nita, 2013). Prosedur isolasi DNA dari sampel organ oviduk kambing betina dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

#### 4.5.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

Uji kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer. Blanko yang digunakan yaitu TE Buffer yang diperoleh dari kit geneaid, TE buffer diteteskan langsung diatas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 $\mu$ L, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 260 nm dan 280 nm. Tahapan awal yang dilakukan, sebanyak 1  $\mu$ L sampel diteteskan diatas pedestal submicroliter cell yang telah dibersihkan dengan menggunakan tissue. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor. Untuk sampel selanjutnya sama seperti tahapan

diatas, dilakukan hingga sampel terakhir. Data yang keluar berupa angka ataupun grafik (Clark dkk, 2001).

Uji kualitas hasil isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen OVGP1. Uji kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Dibersihkan cetakan agarosa dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel agarosa 1% (0,15 g) hingga agarosa larut sempurna. Campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 $\mu$ l dan didinginkan (tidak sampai memadat), kemudian disiapkan sisir dan *plate* untuk membentuk sumuran. Kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dipastikan tidak terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel didiamkan selama 20-30 menit pada suhu ruangan hingga memadat, kemudian diambil sisir secara perlahan supaya tidak merusak gelnya (Fatchiyah dkk, 2009).

Sampel yang akan dielektroforesis dicampur loading buffer dengan komposisi 1  $\mu$ l DNA dan 1  $\mu$ l loading buffer. Semuanya dicampur dengan pipet mikro kemudian diinjeksikan ke dalam sumur pada gel agarosa. Hubungkan elektroda dengan power supply yang dialiri arus listrik 100 volt hingga proses running selesai (sekitar 30 menit) atau mencapai sekitar 1,5 cm dari batas bawah gel agarosa. Pindahkan gel agarosa ke UV-transilluminator dan amati hasilnya. Selanjutnya hasil didokumentasikan dengan menggunakan Gel doc Imaging sehingga memudahkan analisis (Gati, 2012).

#### 4.5.4 Desain Primer

Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genebank* : NM\_001285584.1. Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data NM\_001285584.1 dengan 1952 bp DNA linear. Sepasang sekuen primer yang didapatkan adalah primer *forward* (OVN1\_F) 5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3' (*start*: 1347; *length* : 20 bp; *Tm* : 59,3°C; GC: 55%) dan primer *reverse* (OVN1\_R) 5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3' (*start*: 1695; *length* : 20 bp; *Tm* : 59,1°C; GC : 55%). Tata cara desain primer dapat dilihat pada **lampiran 3**.

#### 4.5.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sampel DNA dari Kambing betina di amplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (OVN1\_F) dan *reverse* (OVN1\_R). Amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1 µL DNA, 1 µL primer *forward* 10 pmol, 1 µL primer *reverse* 10 pmol, 5 µL PCR mix dan 2 µL ddH<sub>2</sub>O ke dalam mikrotube 200 µL. Menurut Zuhriana (2010), tahapan amplifikasi dimulai dari predenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian annealing pada suhu 55,8°C selama 30 detik. Extension pada suhu 72°C selama 30 detik dan post extension pada 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus.

#### 4.5.6 Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Untuk memvisualisasikan produk PCR gen OVGP1 dari organ oviduk Kambing

PE betina, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarosa. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumuran gel agarosa 2% dengan TBE 1x dan digunakan voltase 100 V, selama 30 menit. Kemudian didokumentasikan hasil elektroforesis dengan pada UV-transilluminator scanner.

#### 4.5.7 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi pada produk PCR bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix meliputi dNTPs, Taq Polimerase, ion Mg, serta ddH<sub>2</sub>O dan primer yang berada didalam PCR tube. Metode yang digunakan dalam purifikasi adalah modifikasi protokol *Santella* dengan presipitasi etanol. Protokol purifikasi dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

#### 4.5.8 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen OVGP1 dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer OVN1\_F 10 pmol dan OVN1\_R 10 pmol untuk melihat sekuen Gen OVGP1 sebesar 393 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50 ng/μL untuk dapat dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

#### 4.5.9 Analisa Data

Analisa data yang digunakan yaitu NCBI Blast, Bioedit dan MEGA 7.0. Melalui program NCBI Blast dapat diketahui persentase homologi dan variasi molekuler pada isolat sampel berupa SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)

seperti insersi, delesi, maupun substitusi (transisi atau transversi) dengan mensejajarkan hasil sekuen keempat sampel dengan dengan database NCBI *Genebank* : NM\_001285584.1 penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple allignment*. Analisa lanjutan terhadap variasi molekuler isolat sampel adalah dengan menggunakan program Bioedit untuk melihat jenis mutasi yang terjadi, jenis asam amino yang dihasilkan dan posisi nukleotida yang mengalami mutasi pada isolat sampel. Program MEGA 7.0 mempunyai fungsi yang sama dengan program bioedit.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA dari Sampel Oviduk Kambing PE Betina

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan sampel oviduk dengan menggunakan Genomic DNA Mini Kit Tissue sesuai dengan prosedur. Hasil yang didapatkan berupa ekstraksi DNA total yang selanjutnya dilakukan uji kuantitas dan kualitas. Uji kuantitas dengan menggunakan mesin Nano-200 Micro-asam nukleat spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA total hasil dari isolasi tersebut selanjutnya digunakan untuk proses amplifikasi gen OVGP1 dari kambing PE betina dengan teknik PCR untuk mengetahui sekuen gen OVGP1 dari normal ovarium dan kista ovarium folikuler, sehingga untuk mengetahui apakah gen OVGP1 bisa digunakan sebagai biomarker dari penyakit kista ovarium folikuler.

**Tabel 5.1** Konsentrasi dan Kemurnian DNA Total Kambing PE Betina

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (260/280)
N2	308.35	1.94
NN1	190.53	1.91
AA2	254.90	1.87
AA3	223.32	1.81

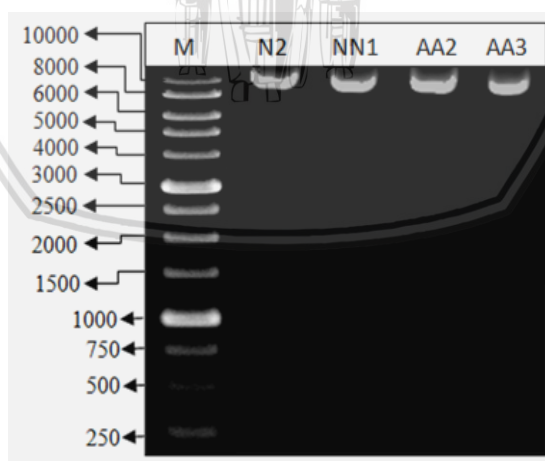
Keterangan : N2: normal 1, NN1: normal 2, AA2: kista ovarium folikuler 1, AA3: kista ovarium folikuler 2

Berdasarkan hasil uji kuantitas tersebut diketahui bahwa keempat sampel dari kambing PE betina memiliki tingkat kemurnian yang baik yaitu masih dalam rentang 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/  $\mu$ L. Menurut Fatchiyah (2011), hasil uji nano drop ialah berupa nilai kemurnian DNA pada  $\lambda$ 260/ $\lambda$ 280 dan nilai



konsentrasi DNA. DNA berkualitas baik berdasarkan uji nano drop memiliki kemurnian 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/ $\mu$ L.

Apabila nilai kemurnian DNA di bawah 1,8 mengindikasikan pada DNA hasil ekstraksi masih terdapat kontaminan berupa senyawa protein. Kontaminasi berupa senyawa protein pada DNA dapat disebabkan oleh tidak adanya penambahan enzim protease pada protokol isolasi DNA (Kartini 2012). Menurut Fatchiyah (2011), nilai kemurnian DNA di atas 2,0 mengindikasikan masih terdapat kontaminan berupa RNA. Hal ini mungkin disebabkan pada penelitian ini tidak dilakukan penambahan ribonuklease. Hasil isolasi DNA total juga diuji secara kualitas dengan menggunakan elektroforesis konsentrasi agarose 1%. Hasil gel elektroforesis agarose 1% dapat dilihat pada **Gambar 5.1**. Hasil gel elektroforesis 1% menunjukkan adanya *band* diatas marker 10.000 bp, hal ini menunjukkan bahwa DNA total yang terisolasi memiliki ukuran diatas 10.000 bp.



**Gambar 5.1** Hasil Elektroforesis DNA Total (Agarose 1%)

Keterangan : M : Marker 1 kb, N2 : normal 1, NN1 : normal 2, AA2 : Kista Ovarium Folikuler 1, AA3 : Kista Ovarium Folikuler 2. 4 sampel hasil isolasi menggunakan Genomic DNA mini kit tissue menunjukkan pita  $\geq 10.000$  bp.

## 5.2 Amplifikasi Gen OVGP1 dengan Metode PCR

Amplifikasi gen OVGP1 dilakukan untuk memperbanyak fragmen gen OVGP1 sebelum dilakukan sekuensing sehingga dapat digunakan untuk mengetahui sekuen gen OVGP1 kambing PE betina normal ovarium dan kista ovarium folikuler. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen OVGP1 diambil dari *genebank* dengan nomer sekuen NM\_001285584.1 dan didesain menggunakan program primer3plus, sehingga didapatkan sepasang primer forward dan reverse yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Metode PCR yang digunakan pada penelitian ini meliputi tahap pradenaturasi, denaturasi, annealing, extension dan post extension dengan suhu dan waktu yang ada pada **Tabel 5.3**.

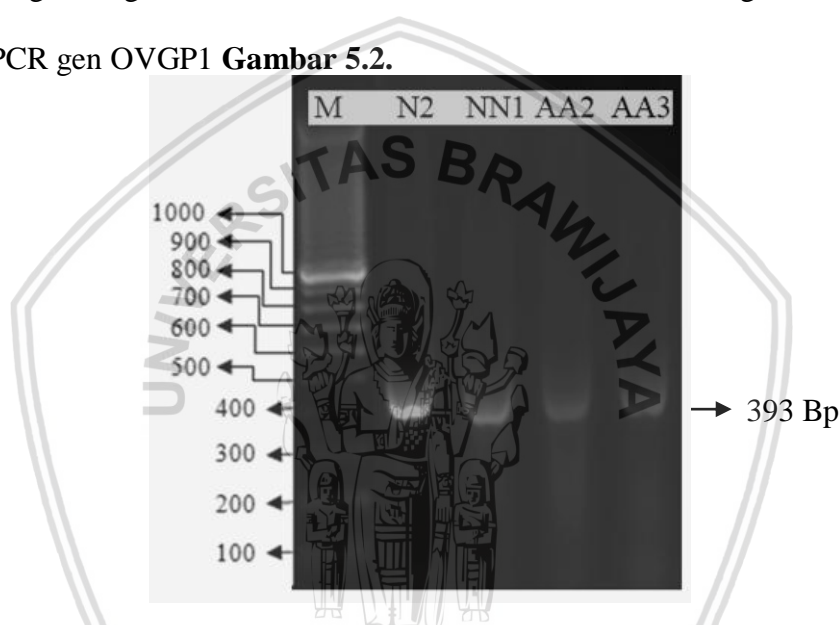
**Tabel 5.2** Urutan Nukleotida Primer gen OVGP1 Kambing PE

Primer	Urutan Oligo Nukleotida
<i>Forward</i> (OVN1_F)	5'-GACTGCAACCCCTACAAGGA-3'
<i>Reverse</i> (OVN1_R)	5'-GAGAGCAGCACCCACTTTTC-3'

**Tabel 5.3** Program PCR untuk Amplifikasi gen OVGP1 Kambing PE (35x siklus)

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	55,8°C
Ekstensi	30 detik	72°C
<i>Post Ekstensi</i>	7 menit	72°C

Hasil produk PCR dilakukan uji kualitatif dengan agarose 2% bertujuan untuk melihat pita DNA gen OVGP1 hasil amplifikasi PCR apakah sesuai target yang diinginkan. Target yang diinginkan dari produk hasil PCR menggunakan primer forward dan reverse yang didesain menggunakan program *Primer3plus* yaitu 393 bp. Hasil yang didapatkan pita DNA gen OVGP1 dengan ukuran 393 bp sesuai dengan target. Berikut adalah hasil dari elektroforesis agarose 2% dari produk PCR gen OVGP1 **Gambar 5.2.**



**Gambar 5.2 Hasil Elektroforesis Produk PCR (Agarose 2%)**

Keterangan : M : Marker 100 bp, N2 : normal 1, NN1 : normal 2, AA2 : Kista Ovarium Folikuler 1, AA3 : Kista Ovarium Folikuler 2. 4 sampel hasil isolasi menggunakan Genomic DNA mini kit tissue menunjukkan pita 393 bp.

Hasil produk PCR kemudian dipurifikasi bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix, ddH<sub>2</sub>O dan primer yang berada di dalam PCR tube. Metode yang digunakan dalam purifikasi adalah presipitasi etanol dengan modifikasi protokol santella. Hasil produk dari purifikasi kemudian disekuensing DNA dari gen OVGP1 dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer OVN1\_F dan OVN1\_R untuk melihat sekuen gen OVGP1 yang teramplifikasi.

### 5.3 Hasil Analisa Sekuen Gen OVGP1

Semua sampel dilakukan sekuensing karena berdasarkan hasil uji kuantitatif dan kualitatif menunjukkan hasil yang baik sesuai dengan target gen OVGP1 yang diinginkan. Hal ini membuktikan bahwa gen OVGP1 telah berhasil di amplifikasi secara spesifik dan hasil purifikasi siap untuk sekuensing. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode sanger yang berdasarkan metode dye terminator labelling. Hasil dari sekuensing dianalisis dengan menggunakan program Bioedit dengan menggunakan system operasi Windows 10.

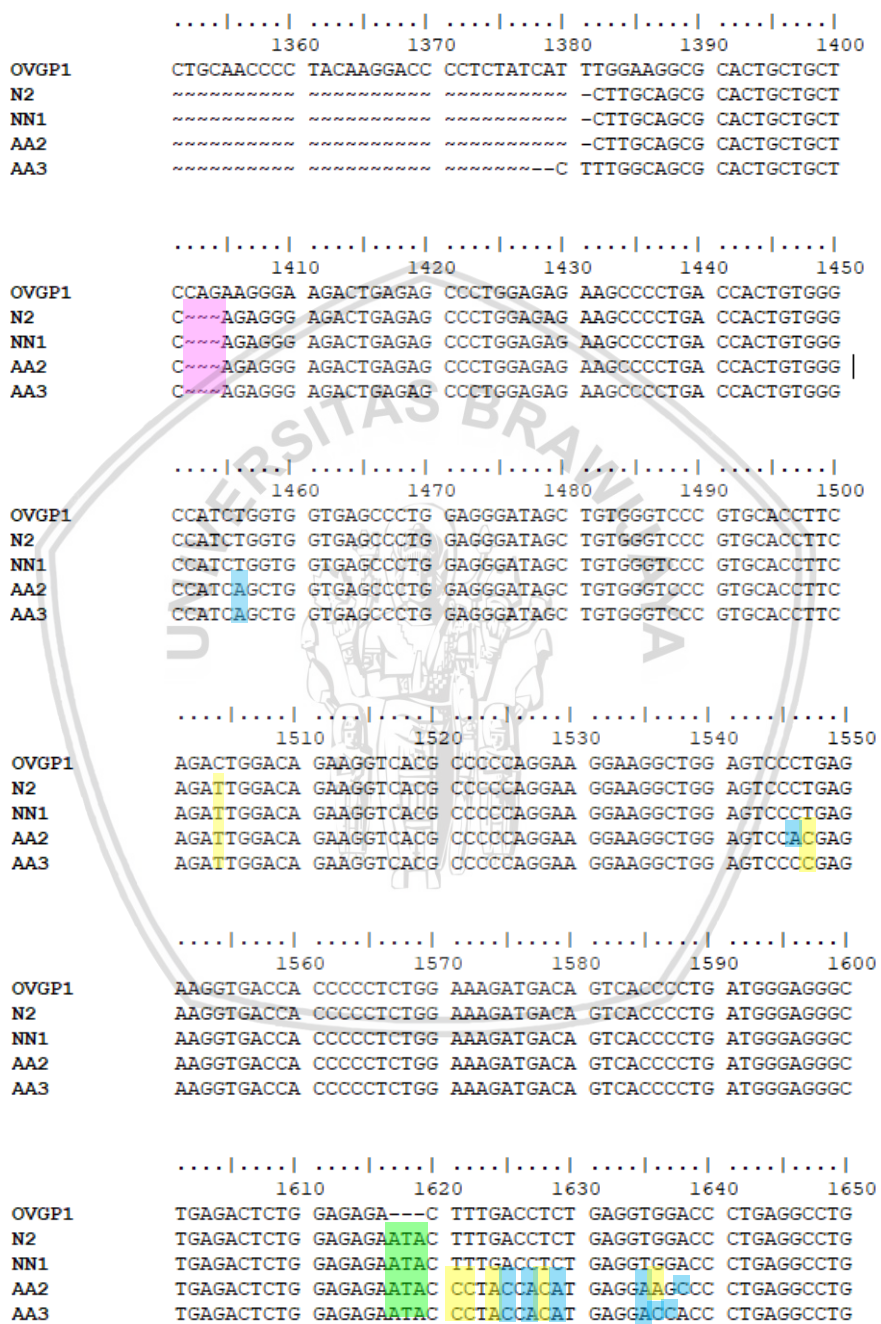
Hasil sekuensing berupa grafik yang menunjukkan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA dan format data berupa fasta. Keempat sampel dimasukkan ke dalam program NCBI BLAST untuk penyejajaran hasil sekuensing dengan genebank NCBI NM\_001285584.1. Hasil penyejajaran keempat sampel dapat dilihat pada **Lampiran 4**. Hasil penyejajaran tersebut untuk melihat besarnya ident dan kesejajaran pada basa sampel dengan database NCBI **Tabel 5.4**.

**Tabel 5.4** Hasil Penyejajaran dengan database NCBI

Sampel	Panjang Basa (Bp)	Ident
N2	1386-1648	97%
NN1	1386-1692	94%
AA2	1386-1648	93%
AA3	1379-1648	93%

Sekuen gen OVGP1 dari keempat sampel N2, NN1, AA2 dan AA3 kambing PE betina disejajarkan dengan referensi yaitu gen OVGP1 *Capra hircus* database

NCBI NM\_001285584.1. Urutan sekuen sampel yang disejajarkan dimulai dari basa ke 1386-1650 dengan total 264 bp **Gambar 5.3.**



**Gambar 5.3** Hasil penyejajaran basa nukleotida menggunakan program bioedit

.Keterangan : ■ Transisi , ■ Tranversi, ■ Inseri, ■ Delesi

Hasil penyejajaran sekuensing keempat sampel dihomologikan dengan database genbank NCBI didapatkan adanya deleksi pada semua sampel nukleotida ke 1402 sampai 1404, sedangkan untuk insersi ditemukan pada semua sampel nukleotida ke 1617 sampai 1619. Adanya transisi untuk semua sampel (C → T) nukleotida ke 1504, transisi pada sampel AA2 dan AA3 nukleotida ke-1547 (T→C), ke 1621-1622 (T→C), ke-1624 (G →A) dan ke-1628 (T→C) dan transisi pada sampel AA2 nukleotida ke-1636 (G → A). Ditemukan adanya transversi pada sampel AA2 dan AA3 nukleotida ke-1456 (T →A), ke-1625 (A →C), ke-1627 (C →A), ke-1629 (C →A), ke-1635 (T →A), transversi pada sampel AA3 nukleotida ke 1636-1637 (G→C) dan transversi pada sampel AA2 nukleotida ke-1546 (C→A) dan ke-1638 (A →C). Menurut Pratiwi (2012), berubahnya susunan basa nukleotida pada hasil sekuen dikenal dengan istilah mutasi, yaitu perubahan genetik (gen atau kromosom) dari suatu individu yang bersifat menurun. Ketika pirimidin diganti oleh pirimidin yang lain, atau purin oleh purin yang lain, mutasi disebut transisi. Ketika pirimidin diganti oleh purin atau sebaliknya, mutasi disebut transversi. Adanya pergantian basa nukleotida tersebut mempengaruhi perubahan pada beberapa susunan asam amino dan perubahan sekuen.

#### 5.4 Hasil Analisa Asam Amino

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	460 470 480 490 500
OVGP1	LQPLQGPLYH LEGALLQKG RLRLERSP* PLWAIWW*AL EG*LWVPCTF
N2	~~~~~XCSALL~RG RLRLERSP* PLWAIWW*AL EG*LWVPCTF
NN1	~~~~~XCSALL~RG RLRLERSP* PLWAIWW*AL EG*LWVPCTF
AA2	~~~~~XCSALL~RG RLRLERSP* PLWAIWW*AL EG*LWVPCTF
AA3	~~~~~X FGSALL~RG RLRLERSP* PLWAIWW*AL EG*LWVPCTF
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	510 520 530 540 550
OVGP1	RLDRSRPQE GRLESLRR*P PPLER*QSPL MGGLRLWRXX FDL*GGP*GL
N2	RLDRSRPQE GRLESLRR*P PPLER*QSPL MGGLRLWREY FDL*GGP*GL
NN1	RLDRSRPQE GRLESLRR*P PPLER*QSPL MGGLRLWREY FDL*GGP*GL
AA2	RLDRSRPQE GRLESLRR*P PPLER*QSPL MGGLRLWREY PTT*GGP*GL
AA3	RLDRSRPQE GRLESLRR*P PPLER*QSPL MGGLRLWREY PTT*GGP*GL

Gambar 5.4 Hasil penyejajaran asam amino menggunakan program bioedit



Akibat adanya delesi, insersi, transisi dan transversi yang terjadi pada basa nukleotida sehingga terjadi perubahan pada susunan asam amino yang terbentuk. Perubahan pada semua sampel asam amino terjadi pada urutan ke-468 adanya gap, sedangkan untuk sampel AA2 dan AA3 perubahan terjadi pada urutan ke-469 (K→R), ke-486 (W →S), ke-541 (F →P), ke-542 (D →T), ke-543 (L→T). Untuk sampel AA2 terjadi perubahan asam amino ke-516 (L→T) dan ke-546 (G→S), sedangkan untuk sampel AA3 terjadi perubahan asam amino ke-516 (L→P) dan ke-546 (G→P).

Kejadian kista ovarium folikuler akan berpengaruh terhadap asam amino yang akan terbentuk. Menurut Lloyd (2000), asam amino yang akan mendominasi saat terjadinya kista ovarium yang diuji dengan menggunakan SDS-PAGE adalah proline, threonine dan serine. Penelitian terbaru oleh Anwar (2007), pada kejadian kista ovarium yang diukur kadar asam amino dengan SDS-PAGE melalui cairan kistanya, asam amino yang mendominasi adalah proline (P), threonine (T) dan serine (S). Secara spesifik pada kista ovarium folikuler belum pernah dilakukan penelitian terkait kandungan asam amino yang mendominasi. Untuk presentase asam amino dapat dilihat pada **Tabel 5.5**.

Serine dan threonine merupakan asam amino gugus hidroksil yang cukup reaktif, mampu membentuk ikatan hidrogen dengan berbagai substrat polar. Sedangkan proline merupakan asam amino yang non-reaktif. Proline merupakan asam amino yang unik dan bersifat nonpolar, sehingga tidak dapat menempati konformasi di rantai utama yang mudah dilakukan oleh asam amino lainnya (Matthew *et al*, 2003).



**Tabel 5.5** Presentase asam amino dari tiap sampel dan gen OVGP1

	OVGP1	N2	NN1	AA2	AA3
A	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
L	21,3	21,3	21,3	18,8	18,8
G	11,3	10,0	10,0	8,8	8,8
S	5,0	6,3	6,3	7,5	8,8
Q	3,8	2,5	2,5	2,5	2,5
K	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0
R	16,3	17,5	17,5	17,5	17,5
E	6,3	7,5	7,5	7,5	7,5
P	11,3	11,3	11,3	13,8	13,8
W	6,3	6,3	6,3	5,0	5,0
I	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
V	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
C	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
T	1,3	1,3	1,3	4,0	4,0
F	2,5	2,5	2,5	1,3	1,3
D	2,5	2,5	2,5	1,3	1,3
M	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Y	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3

Berdasarkan hasil presentase pada **Tabel 5.5** dapat diketahui pada sampel AA2 dan AA3 yang mengalami kista ovarium folikuler dapat mempengaruhi dari susunan basa nukleotida sehingga membuat perubahan pada susunan asam amino yang terbentuk. Hasil penelitian ini pada urutan asam amino didapatkan adanya peningkatan jumlah asam amino proline (P), threonine (T) dan serine (S) dibandingkan dengan asam amino dari OVGP1 dan ovarium normal meskipun jumlah peningkatan tidak terlalu signifikan. Kejadian kista ovarium folikuler dapat mempengaruhi sekuen gen OVGP1 sehingga mempengaruhi perubahan susunan dan jumlah asam amino yang terbentuk. Menurut Herry (2015), estrogen secara langsung mempengaruhi aktivitas hipofisa anterior. Hormon estrogen tersebut akan mereduksi proses transkripsi dan stabilitas mRNA yang berkaitan dengan aktivitas GnRH.

Serine dan threonine merupakan salah satu faktor pertumbuhan dan pematangan folikel-folikel di ovarium, saat dibuahi ekspresinya akan berkurang (Han li *et al*, 2017). Kista ovarium folikuler terjadi akibat kurangnya hormon LH sehingga terjadi pembentukan folikel-folikel yang tidak terovulasi dan penumpukan estrogen dalam darah. Ekspresi serine dan threonine akan meningkat karena folikel-folikel yang tidak terovulasi dan tidak dapat dibuahi.

Proline berperan penting dalam perkembangan jaringan kolagen di ovarium dan kolagen merupakan penyusun utama dinding ovarium (Hengky, 2010). Kejadian kista ovarium folikuler akan menyebabkan adanya benjolan pada korteks ovarium dan penumpukan kolagen ovarium stroma sebagai dasar permukaan epitel yang terkait dengan kista ovarium folikuler (Marisa *et al*, 2009). Adanya penumpukan kolagen ovarium akan menyebabkan peningkatan jumlah proline, karena proline berperan dalam perkembangan kolagen di ovarium.

Kejadian kista ovarium folikuler menyebabkan peningkatan pada estrogen. Hormon estrogen mempunyai sel target pada sitoplasma dan kromatin inti sel, dalam kasus kista ovarium folikuler jumlah estrogen yang tinggi akan mempengaruhi OVGP1. Karena aktifitas OVGP1 merupakan estrogen dependent. Kejadian kista ovarium folikuler mengakibatkan perubahan pada sekuen gen OVGP1 sehingga kode sintesis protein akan berubah dan berkorelasi dengan perubahan sintesis OVGP1. Kesimpulannya gen OVGP1 dapat digunakan sebagai penanda penyakit kista ovarium folikuler sejak dini.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Sampel kambing PE betina dengan kondisi kista ovarium folikuler AA2 dan AA3 memiliki homologi gen OVGP1 sebesar 93% dengan genebank NM\_001285584.1. Analisa sekuen yang didapatkan berupa perubahan pada basa nukleotida karena terjadi deleksi, insersi, transisi dan transversi sehingga mempengaruhi susunan dari asam amino yang terbentuk.
2. Pada sampel kambing PE dengan kista ovarium folikuler didapatkan hasil adanya peningkatan jumlah dari asam amino proline, threonine dan serine bila dibandingkan dengan sampel kambing normal (N2 dan NN1). Adanya peningkatan tersebut dapat disimpulkan bahwa gen OVGP1 bisa digunakan sebagai penanda penyakit kista ovarium folikuler sejak dini.

### 6.2 Saran

Dalam upaya membentuk indukan dan anakan yang berkualitas pada kambing PE, tetapi masih diperlukan riset lebih jauh mengenai identifikasi korelasi gen OVGP1 dengan kista ovarium jenis lainnya. Sehingga gen OVGP1 ini bisa tepat digunakan sebagai biomarker kejadian kista ovarium folikuler sejak dini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anwar Suleman. 2007. *The characterisation of mucin in a mature ovarian teratoma occurring in an eight year old patient*. International Journal of Medical Sciences .4(2):115-123.
- Aron B, Saddat N dan Subandriyo. 2016. *Kambing Peranakan etawa (PE)* . Jakarta. Indonesian Agency For Agricultural Research And Development (Iaard) Press.
- Balai Penelitian Ternak [Balitnak]. 2001. *Kambing PE penghasil daging sekaligus susu*. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 23 No. 4, Ciawi-Bogor.
- Benson, Ralp C. 2008. *Buku Saku Obstetri dan Ginekologi*. Jakarta: EGC.
- Bioninja. 2016. *DNA Sequencing*. <http://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-7-nucleic-acids/71-dna-structure-and-replic/dna-sequencing.html>. [25 Januari 2018].
- Buhi, W. 2002. *Characterization And Biological Roles Of Oviduk-Specific,Oestrogen-Dependent Glycoprotein*.Department Of Obstetrics And Gynecology. University Of Florida College Of Medicine.
- Campbell, Reece dan Mitchel. 2002. *Biologi Terjemahan Edisi Kelima jilid 1*. Jakarta. Erlangga.
- Cheryl Horlen, BCPS. 2010. *Ovarian Cysts*. University of the Incarnate Word.Feik School.San Antonio, Texas.
- Choudhary, dkk. 2005. *DNA Polymorphism of Leptin Gene in Bos Indicus and Bos Taurus Cattle*. Indian Veterinary Research Institute, Animal Genetics Division, Molecular Genetics Lab, Izatnagar, India.
- Clark, W. 2001. *An Introduction To Dna: Spectrophotometry, Degradation, And The 'Frankengel' Experiment*. Department Of Biological Sciences University Of Alberta Edmonton, Alberta, Canada.
- Darmo,H. 2001. *Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (Pcr)*. Unitas, Vol.9, No.1 : 17-29.
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan. 2003. *Upaya dan potensi kebijakan pemerintah dalam membina dan mengembangkan usaha peternakan (kambing-domba) Indonesia*. Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan. Departemen Pertanian RI, Jakarta.
- Elliwati, H. 2015. *Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (Pcr) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan*. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, dan S. Rahayu. 2009. *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. LSIH Press. Malang.
- Fatchiyah, E.L. Arumningtyas, S. Widyarti dan S. Permana. 2011. *Biologi Molekuler-Prinsip Dasar Analisis*. Malang: Erlangga.
- Fatchiyah. 2015. *Prinsip Dasar Bioinformatika*. UB Press. Malang.
- Gati W . 2012. *Metode Uji Kualitatif Dna Dengan Elektroforesis Gel Agarosa*. Balai Besar Perbenihan Dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya
- Han Li and Ri-Cheng. 2017. *Follicular Development and Oocyte Growth*. Springer International Publishing AG. Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes.
- Hengky S. 2010. *Kandungan Vitamin C pada Ovarium Ikan Lele Saat Siklus Reproduksi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UNSTRAT.
- Herry, A. 2015. *Pemberantasan Kasus Kemajiran Pada Ternak Menuju Kemandirian Dibidang Kesehatan Reproduksi Hewan Dan Ketahanan Pangan Di Indonesia*. Surabaya. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Karim MR, Faraidoon A, Muhammad S. 2017. *Gross And Histopathological Study Of The Genitalia In Goats: 1. Ovaries*. J Veter Sci Med. 2017;5(1): 4.
- Kartini AR. 2012. *Karakterisasi Molekular Padi Transgenik dengan Beberapa Metode Isolasi DNA*. Departemen Biokimia. FMIPA. IPB.
- Kementerian Pertanian RI. 2017. *Statistik Peternakan Dan Kesehatan Hewan*. Jakarta. Direktorat Jenderal Peternakan Dan Kesehatan Hewan
- Khan Mir, Haq Me, Rehman A, Mohsin I, Hassan M, Ahmad N And Kausar R, 2017. *Diagnosis Of Ovarian Follicular Cyst In A Beetal Goat By Ultrasonography And Treatment With GnRh-Pgf2α*. Pak Vet J, 37(1): 120-122.
- Kusuma, B. D. & Irmansyah. 2009. *Menghasilkan Kambing Peranakan Etawa Jawa Kontes*. PT AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- Llyod K, Beatrice W, Paul T and Hediye E. 2000. *MUC-6 mucin is a major component of blood group substance from human ovarian cyst fluid*. Biochimica et Biophysica Acta 410-414. New York
- Matthew,J and Robert,B. 2003. *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*. Bioinformatics for Geneticists. ISBNs: 0-470-84393-4 (HB); 0-470-84394-2 (PB).



- Marisa,R and Esther,O. 2009. *Gynecologic Pathology*. Elsevier Churchill Livingstone.
- Mileski, A. and P. Myers. 2004. *Caprahircus*, Animal Diversity Web. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Capra\\_hircus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Capra_hircus.html). [30 Januari 2018].
- Mulyono, Subangkit & B. Sarwono. 2008. *Penggemukan Kambing Potong*. Depok: Penebar Swadaya.
- Nita A. 2013. *Isolasi Dna Manusia (Epitelial Mulut Dan Darah) Dan Teknik Pcr Dan Isolasi Protein Dari Darah, Elektroforesis Agarose Dan Sds-Page*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Pamungkas F.A., A. Batubara, M. Doloksaribu dan E. Sihite. 2009. *Potensi Beberapa Plasma Nutfah Kambing Lokal Indonesia*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian.
- Prabowo A. 2010. *Budidaya Ternak Kambing (Materi Pelatihan Agribisnis bagi KMPH)*. BPTP Sumatera Selatan.
- Pratiwi, D.A. 2012. *Biologi Untuk Sma/Ma Kelas Xii*. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Pratiwi, H., F. Aulia, Herawati, I. Nurul. 2017. *Isolation and Profilling Oviduk Specifict Glycoprotein in Ovidukal Fluid OF Goat Kacang (Capra aegagrus hircus)*. Journal of Environmental Engineering & Sustainable Technology. Vol. 04 No. 01, July 2017, Pages 41-44.
- Rasjidi, Imam. 2008. *Manual Prakancker Serviks*. Jakarta: Sagung Seto.
- Saint-Dizier M, Marnier C, Tahir MZ, Grimard B, Thoumire S,Chastant-Maillard S and Reynaud K. 2014. *OVGP1 is expressed in the canine oviduk at the time and place of oocyte maturation and fertilization*. Mol. Reprod. Dev. 81 972–982.
- Sambrook, J. Dan Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3 Th Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 78-125.
- Saniya, L. 2017. *Extra-Ovidukal Expression Of Ovidukal Glycoprotein 1 In Mouse: Detection In Testis, Epididymis And Ovary*. Department Of Biological Sciences, Sunandan Divatia School Of Science, Nmims University.
- Sarah M, Michelle M, Marilyn B and Laurie L. 2009. *Ovidukal Glycoprotein (OVGP1, MUC9): A Differentiation-Based Mucin Present In Serum Of Women With Ovarian Cancer*. Institute Of Canada To N.A. And A Canadian

Institutes For Health Research. International Journal Of Gynecological Cancer.

Schork, N. J., Fallin, D., & Lanchbury, J. S. 2000. *Single Nucleotide Polymorphisms and The Future of Genetic Epidemiology*. Clin Genet. 58, hlm. 250-264. Diakses dari [statgen.ncsu.edu/~dahlia/.../S02/clingen250.pdf](http://statgen.ncsu.edu/~dahlia/.../S02/clingen250.pdf) [30 Januari 2018].

Smeltzer, Suzanne C. dan Bare, Brenda G. 2002. *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah Brunner dan Suddarth (Ed.8, Vol. 1,2)*, Alih bahasa oleh Agung Waluyo...(dkk), EGC, Jakarta.

Sukardja, I Dewa Gede., 2000. *Onkologi Klinik edisi 2*. Surabaya: Airlangga University Press.

Susianti., Indah sari. 2017. *Potensi Sirsak (Annona muricata) Sebagai Pencegahan Kista Ovarium*. Universitas Lampung. Majornity. Vol 6

Woo MMM, Alkushi A, Verhage HG, Magliocco AM, Leung PCK, Gilks CB and Auersperg N .2004. *Gain of OGP, an estrogen-regulated oviduk-specific glycoprotein, is associated with the development of endometrial hyperplasia and endometrial cancer gain of OGP, an estrogen-regulated oviduk-specific glycoprotein, is associated with the development*. Clin. Cancer Res. 10 7958–7964.

Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta. Erlangga.

Zuhriana, K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Universitas Negeri Gorontalo. Saintek Vol 5, No 6..